

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-238018

(43)公開日 平成7年(1995)9月12日

(51)Int.Cl.⁶
A 6 1 K 31/22
C 1 2 P 13/02
// (C 1 2 P 13/02
C 1 2 R 1:07)

識別記号 ADZ
9454-4C
2121-4B

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数3 O L (全7頁)

(21)出願番号 特願平6-27802

(22)出願日 平成6年(1994)2月25日

(71)出願人 000006677

山之内製薬株式会社

東京都中央区日本橋本町2丁目3番11号

(72)発明者 普原 武雄

埼玉県浦和市大谷場1-4-30 ルーミー
浦和208号

(72)発明者 清水 靖代

東京都国立市富士見台2-1-30

(72)発明者 山口 洋司

埼玉県大宮市奈良町136-51-10-205

(74)代理人 弁理士 渡邊 一平 (外2名)

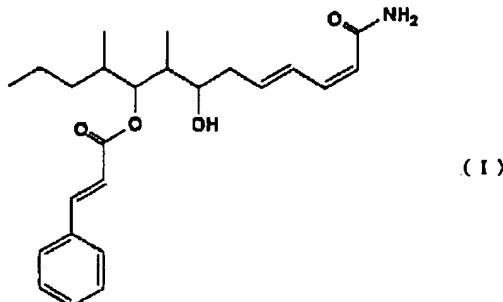
(54)【発明の名称】 抗真菌性抗生物質及びその製造法

(57)【要約】

【構成】 下記構造式(I)で示されるYL-0370

9B-A物質からなる抗真菌性抗生物質。

【化1】



【効果】 強い抗真菌活性を示し、医薬、殊に抗真菌性抗生物質として有用である。

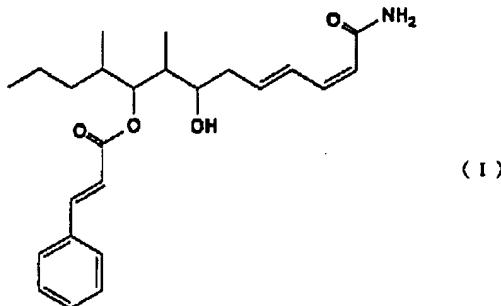
1

2

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記構造式(I)で示されるYL-03709B-A物質からなる抗真菌性抗生物質。

【化1】



【請求項2】 バシルス(Bacillus)属に属し、請求項1記載のYL-03709B-A物質を生産する能力を有する微生物を培地に培養し、培養物中に上記YL-03709B-A物質を生産、蓄積させ、培養物から生成蓄積したYL-03709B-A物質を単離採取することを特徴とするYL-03709B-A物質の製造法。

【請求項3】 バシルス(Bacillus)属に属する微生物が、バシルスエスピーエスピー(Bacillus sp.)YL-03709B(FERM P-14126)である請求項2記載の製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、医薬、殊に抗真菌性抗生物質として有用な新規化合物及び発酵法による該化合物の製造法に関する。

【0002】

【従来の技術】 1950年代以降の抗生物質に関する研究開発の急速な進歩及びその広範な普及により、細菌性の感染症はそのほとんどが駆逐されるに至っている。その一方で、平素は無害な弱病原性微生物による感染症(日和見感染)が近年大きな問題となりつつある。日和見感染は、(1)免疫不全症や悪性腫瘍等の疾病又は免疫抑制剤や抗炎症剤等の投与によって免疫機能が低下した場合、(2)抗生物質投与による共生菌の抑制から生じる菌交代、(3)医療機関内におけるいわゆる院内感染などが原因とされる。このような日和見感染の中でも真菌症がその多くを占めている。そこで、抗真菌性抗生物質として、従来、アムホテリシンB、グリセオフルビン、ナイスタチン等の物質が知られている。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 前述のように、近年、真菌症が増大する中で、より有効な抗真菌性抗生物質の創製が切望されている。このような背景において、本発明者らは、天然に存在する多くの微生物が生産する物質について研究を行ったところ、バシルス属に属し、真菌に対して抗菌活性を有する物質を生産する能力を有する微生物を見い出し、この微生物を培地に培養することに

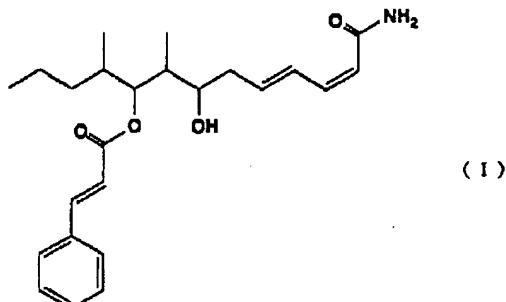
よって、同培地中に抗真菌作用を有する新規物質を生産させ、この物質を単離し、本発明を完成した。したがつて、本発明の目的は、有用な抗真菌活性を有する新規抗生物質を提供することにある。また、本発明の別の目的は、新規抗真菌性抗生物質を得るために新規な製造法を提供することにあり、更に上記抗生物質を生産する新規微生物を提供することにある。

【0004】

【課題を解決するための手段】 すなわち、本発明は下記構造式(I)で示されるYL-03709B-A物質からなる抗真菌性抗生物質である。

【0005】

【化2】



20

【0006】 また、本発明は、バシルス(Bacillus)属に属するYL-03709B-A物質生産菌を培養し、培養物中に上記YL-03709B-A物質を生産、蓄積させ、培養物からこれらの物質を単離採取することを特徴とするYL-03709B-A物質の製造法である。

30

【0007】 本発明の新規抗真菌性抗生物質は、YL-03709B-A物質生産菌を培養し、培養物中に該抗生物質を生産、蓄積させ、培養物中から該抗生物質を採取することによって製造することができる。また、製造される本発明のYL-03709B-A物質は、分子内に不斉炭素原子を有することから、光学異性体等の各種異性体が存在する。本発明の有効成分は、これらの異性体の分離されたもの及びそれらの混合物であってもよい。本発明YL-03709B-A物質を生産する菌株としては、例えば、沖縄、石垣島で採取した土壠から分離した微生物バシルスエスピーエスピー(Bacillus sp.)YL-03709B株を挙げることができる。以下、この菌株の菌学的性状を説明する。

40

【0008】 バシルスエスピーエスピー(Bacillus sp.)YL-03709B株の菌学的性質：

1. 形態的特徴

栄養寒天培地上で、32℃、5日間培養した細胞は、0.6~1.0×2.0~7.0μmの桿菌でグラム染色は陽性であり、運動性を有する。また、菌体の中央~末端よりに1個の胞子を形成する。この胞子は梢円形で100℃、10分の加熱に対し耐性である。

50

2. 各種培地における生育状態

各種培地における生育状態は以下に示す通りである。培養は32℃で2~7日間行い、常法に従って観察した。色調の記載については色の標準（日本色彩研究所）によった。

(1) 肉汁寒天培地

クリーム～黄茶灰で光沢のある不透明なコロニーを形成する。色素の産生は認められない。

(2) グルコース肉汁寒天培地

*クリーム～黄茶灰で光沢のある不透明なコロニーを形成する。色素の産生は認められない。

(3) 肉汁液体培地

皮膜を形成し培地上部が混濁する。

【0010】3. 生理学的性質

下記表1に示すとおりである。

【表1】

*

| | |
|---------------------|---------|
| 硝酸塩の還元： | 陽性 |
| V P テスト： | 陰性 |
| インドールの生成： | 陰性 |
| 硫化水素の生成： | 陰性 |
| デンプンの加水分解： | 陰性 |
| クエン塩の利用： | 陽性 |
| マロン酸塩の利用： | 陽性 |
| ゼラチンの液化： | 陽性 |
| リジンの加水分解： | 陰性 |
| オルニチンの加水分解： | 陰性 |
| アルギニンの加水分解： | 陰性 |
| エスクリンの利用： | 陽性 |
| ウレアーゼ： | 陰性 |
| チロシンの分解： | 陰性 |
| ジオキシアセトンの生成： | 陰性 |
| オキシダーゼ： | 陽性 |
| カタラーゼ： | 陽性 |
| 生育温度： | 15~40℃ |
| 生育至適温度： | 24~37℃ |
| 生育pH： | 6~9 |
| 生育至適pH： | 7~8 |
| 嫌気条件での生育： | 陰性 |
| O F テスト： | 非分解性 |
| N a C I 添加肉汁培地での生育： | 3%以下で生育 |

【0011】4. 炭素源の利用性

下記表2に示すとおりである。

※【表2】

※

| | | | |
|--------|---|---------|---|
| グルコース | + | シューカロース | - |
| キシロース | - | ラムノース | - |
| アラビノース | - | マンニトール | + |
| マンノース | + | イノシトール | - |
| フルクトース | + | アドニトール | - |
| マルトース | + | ソルビトール | - |

注) + : 生育する - : 生育しない

【0012】5. メナキノンの分析

主要な菌体メナキノンはMK-7である。

6. DNAのGC含量

mol% G+C = 41.5

【0013】以上の菌学的性質をまとめると、本菌株はグラム陽性有芽胞桿菌で運動性を有する。また、好気性であり、V P テスト陰性、オキシダーゼ試験陽性、カタラーゼ試験陽性、硝酸塩の還元性を有し、15~40℃の中温で生育する。このような性状を有する菌をバージーズ-マニュアル-オブ-システムティック-バクテリオロ

ジー (Bergery's Manual of Systematic Bacteriology, 1984) 及びその他の文献によって検索し、本菌株はバシリス (Bacillus) 属に属する細菌であると判断された。また、本菌株に類似した菌種を検索すると、バシリスバディウス (Bacillus badius)、バシリス ブレビス (Bacillus brevis)、バシリス サーキュランス (Bacillus circulans) が挙げられる。本菌株と上記3種の類似菌株との比較 (文献値) を下記表3に示す。

【0014】

【表3】

| 本菌株 | B. badius | B. brevis | B. circulans | |
|-------------------|---------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------|
| 細胞の大きさ | 0.6-1.0 × 2-7 μm | 0.8-1.2 × 1.5-4 μm | 0.6-0.9 × 1.5-4 μm | 0.5-0.7 × 2-5 μm |
| オキシダーゼ | + | N D | N D | - |
| カタラーゼ | + | + | + | + |
| 嫌気条件での生育 | - | - | - | d |
| V P テスト | - | - | - | - |
| ゼラチンの液化 | + | N D | d | d |
| デンプンの加水分解 | - | - | d | + |
| クエン酸の利用 | + | - | d | d |
| チロシンの分解 | - | - | N D | N D |
| 硝酸塩の還元 | + | - | d | d |
| インドールの生成 | - | - | - | - |
| ジオキシアセトンの生成 | - | - | - | - |
| NaCl 添加肉汁寒天培地での生育 | | | | |
| 2 % NaCl | + | N D | N D | N D |
| 5 % NaCl | - | + | - | d |
| 各種温度での生育 | | | | |
| 5 °C | - | - | - | - |
| 10 °C | - | - | - | d |
| 30 °C | + | + | d | + |
| 40 °C | + | + | + | + |
| 50 °C | - | + | d | - |
| 55 °C | N D | - | d | - |
| 60 °C | N D | - | - | - |

注) N D : not determined.

d : 11-89% of strains positive.

【0015】バージーズ-マニュアル-オブ-システムティック-バクテリオロジイ (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 1984) の記載によると、これら3種に共通な性質として、グラム染色性は陽性、胞子を菌体の中央かやや末端に1個形成し、VPテスト、インドール反応、ジオキシアセトンの生成能は陰性であることが挙げられる。しかし、Bacillus badius、Bacillus brevis、Bacillus circulansの3種とも、菌のサイズが本菌株とは異なり、Bacillus badiusは5%NaCl肉汁寒天培地上での生育が陽性で、50°Cでも生育する点において、本菌株とは異なる。また、Bacillus circulansは、デンプンの加水分解性が陽性であることから、本菌株とは異なる。以上のことより、本菌株はBacillus badius、Bacillus brevis、Bacillus circulansと必ずしも一致しない。

【0016】従って、今回本菌株をバシリス エスピー (Bacillus sp.) YL-03709Bと命名した。本菌株は工業技術院生命工学工業技術研究所に、F E R M P-14126として寄託されている。なお、微生物は人工的に、また自然に変異を起こし易いが、本発明において用いられるバシリス エスピー YL-03709B株は、天然から分離された菌株の他に、これを紫外線、X線、化学薬剤などで人工的に変異させたもの及びそれらの人工変異株についても包含するものである。

【0017】(製造法) 本発明の新規抗生物質の製造法を実施するに当たり、該抗生物質の生産菌株バシリス エスピー YL-03709B株を栄養源を含有する培地に接種し、好気的に発育させることにより本発明の新規抗生物質を含む培養物が得られる。培養に用いる培地は、使用する微生物が生育可能な培地であればよく、合成培地、半合成培地あるいは天然培地を用いることができる。培地に添加する栄養物としては、細菌の栄養源と

して公知のものを使用すればよい。例えば市販されているペプトン、肉エキス、コーンスティーブリカー、綿実粉、落花生粉、大豆粉、酵母エキス、小麦胚芽、カゼインの水解物、魚粉、硝酸ソーダ、硝酸アンモニウム等の無機又は有機の窒素源、市販されている糖蜜、グルコース、マルトース、フルクトース、マンニトール、グリセリン、ポテトスター、コーンスター、デキストリン、可溶性澱粉等の炭水化物あるいは脂肪等の炭素源が使用できる。

【0018】また金属塩として、Na、K、Mg、Ca、Zn、Fe、Mn、Co、Cu等の硫酸塩、塩酸塩、硝酸塩、磷酸塩、炭酸塩等を必要に応じて添加できる。更に必要に応じてパリン、ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン、トリプトファン、メチオニン、リジン、アルギニン、グルタミン酸、アスパラギン酸等のアミノ酸や、ビタミン類、オレイン酸メチル、ラード油、シリコン油、界面活性剤等の抗生物質生産促進物質又は消泡剤を適宜使用できる。これらのもの以外でも、本発明YL-03709B-A物質生産菌が利用し、本発明YL-03709B-A物質の生産に役立つものであれば、いずれの添加物も使用することができる。

【0019】培養法としては、一般の抗生物質の生産方法と同様に行えばよく、その培養方法は固体培養でも液体培養でもよい。液体培養の場合は静置培養、振盪培養、攪拌培養のいずれを実施してもよいが、特に通気攪拌培養が好ましい。培養条件として、培養温度は生産菌が発育し、本発明の抗生物質を生産しうる温度、すなわち15°C~40°Cの範囲で適宜変更できるが、およそ24°C~37°Cが好ましい。培地のpHは6~9の範囲で適宜変更できるが、pH7~8が好ましい。培養時間は種々の条件によって異なり、10時間~168時間であるが、通常24時間~120時間程度で培養液中に蓄積

される本発明の抗生物質が最高力価に達する。

【0020】培養物から目的とする本発明の抗生物質を単離するには、微生物の產生する代謝産物に用いる通常の抽出、精製の手段が適宜利用できる。培養物中の該抗生物質は培養液をそのままか、又は遠心分離あるいは培養物に濾過助剤を加えて濾過して得られた培養濾液に、酢酸エチル、クロロホルム等の水と混和しない有機溶媒を加えて抽出する。また培養濾液を適宜の担体に接触させ、濾液中の該抗生物質を吸着させ、次いで適當な溶媒で溶出することにより該抗生物質を抽出することができる。例えば、アンバーライト XAD-2、ダイヤイオン HP-20、ダイヤイオン CHP-20、又はダイヤイオン SP-900 のような多孔性吸着樹脂に接触させて該抗生物質を吸着させる。

【0021】次いで、メタノール、エタノール、アセトン、アセトニトリル等の有機溶媒と水の混合液を用いて該抗生物質を溶出させる。このときの有機溶媒の混合比率を低濃度より段階的又は連続的に高濃度まで上げていくことにより、該抗生物質の含まれる比率の高い画分を得ることができる。酢酸エチル、クロロホルム等の有機溶媒で抽出する場合には、培養濾液にこれらの溶媒を加え、よく振盪し、該抗生物質を抽出する。次に、上記の各操作法を用いて得た該抗生物質含有画分は、シリカゲル、ODS 等を用いたカラムクロマトグラフィー、遠心液々分配クロマトグラフィー、ODS を用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 等の常法により、更に純粹に分離精製することができる。

【0022】

【実施例】以下、本発明を実施例に基づいて更に詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0023】(実施例) グルコース 1%、ポテトスター^チ 2%、酵母エキス 0.5%、ポリペプトン 0.5%、炭酸カルシウム 0.4% を含む種培地 (pH 7.0) を 500mL 容の三角フラスコに 100mL ずつ分注し、121℃で 20 分間滅菌した。ペネット寒天培地上に良く生育させたバシリス エスピー YL-03709B 株の菌体を搔きとて接種し、28℃で 72 時間通気攪拌培養を行い、種培養液とした。次に、上記と同じ組成の生産培地に 2% の割合で種培養液を植菌し、28℃で 72 時間通気攪拌培養した。

【0024】このようにして培養した 2.5L の培養液を濾過後、この濾液を pH 3 に調整し、酢酸エチルで抽出後、減圧下で濃縮して抽出物 344mg を得た。この抽出物を、キーセルゲル 60 (メルク社製) を用いたフラッシュクロマトグラフィーに付し、クロロホルム/メタノール (9:1) で溶出した活性画分を、更に酢酸エチル及び飽和 NaHCO₃ 水溶液によって二層分配し、酢酸エチル抽出画分 42mg を得た。この抽出画分を、YMC-GEL (YMC 社製) を用いたフラッシュクロ

10

20

30

40

40

マトグラフィーに付し、メタノール/水 (9:1) で溶出した活性画分を、最終的に Pegasil ODS (センシュー科学社製) 及びアセトニトリル/水 (54:46) を用いた HPLC により精製し、YL-03709B-A 物質を 4.9mg 単離した。

【0025】上記のようにして抽出、精製、単離された YL-03709B-A 物質は、下記の物理化学的諸性質を有する。

(1) 色及び形状：無色で透明又は半透明の無定型アメ状物質。

(2) 酸性、中性、塩基性の区別：中性。

(3) 溶剤に対する溶解性：メタノール、エタノール、アセトン、酢酸エチル、クロロホルム、ジメチルスルホキシド等には溶けるが、水には溶け難く、ヘキサンにはほとんどとれない。

(4) 分子量：399

(5) 分子式：C₂₄H₃₃NO₄

(6) 比旋光度：[α]_D-106.1° (c 0.33, 溶剤：メタノール)

(7) マススペクトル (FAB-Mass) : m/z 400.2449 (MH⁺; C₂₄H₃₃NO₄, Δ-3.8mmu)

(8) 紫外線吸収スペクトル (メタノール中) : λ_{max} 217 (ε 19000), 222 (ε 18000), 263 (ε 31000) nm

(9) 赤外線吸収スペクトル (フィルム法) : 3340, 2960, 1670 cm⁻¹

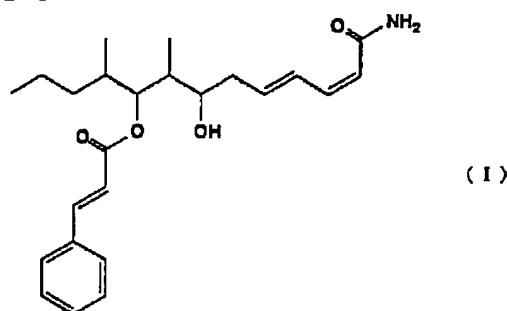
(10) ¹H-NMR スペクトル (CDCl₃ 中, 500MHz) : 図 1 に示す。

(11) ¹³C-NMR スペクトル (CDCl₃ 中, 125MHz) : 図 2 に示す。

上記の物理化学的諸性質から、YL-03709B-A 物質の化学構造式を下記のように決定した。

【0026】

【化3】



【0027】

【発明の効果】本発明 YL-03709B-A 物質は、強い抗真菌活性を示し、医薬、特に抗真菌性抗生物質として有用である。表 4 に YL-03709B-A 物質の抗真菌活性を示す。なお、最小発育阻止濃度 (MIC (μ g/mL)) は、サブロー・デキストロース寒天培地を用いた寒天希釈法により測定した。

【0028】

【表4】

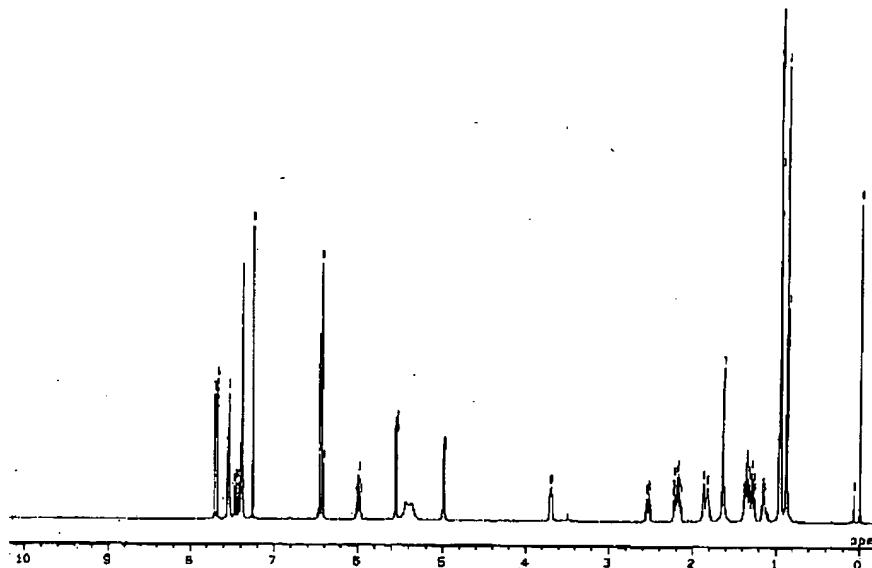
YL-03709B-A物質の抗真菌活性

| 試験菌 | MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$) |
|--|---------------------------------|
| カンジダ アルビカヌス (<i>Candida albicans</i>) | 25 |
| カンジダ パラプシロシス (<i>Candida parapsilosis</i>) | 25 |
| ピヒア アングスタ (<i>Pichia angusta</i>) | 0.75 |
| ロドトルラ アクタ (<i>Rhodotorula acuta</i>) | 0.05 |
| トリゴノブシス バリアビリス (<i>Trigonopsis variabilis</i>) | 6.25 |
| サッカロミセス セレビシエ (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) | 50 |
| サッカロミセス サケ (<i>Saccharomyces sake</i>) | 50 |
| クリプトコッカス エスピー (<i>Cryptococcus sp.</i>) | 8.25 |
| アスペルギルス ニガー (<i>Aspergillus niger</i>) | ≥ 50 |

【図面の簡単な説明】

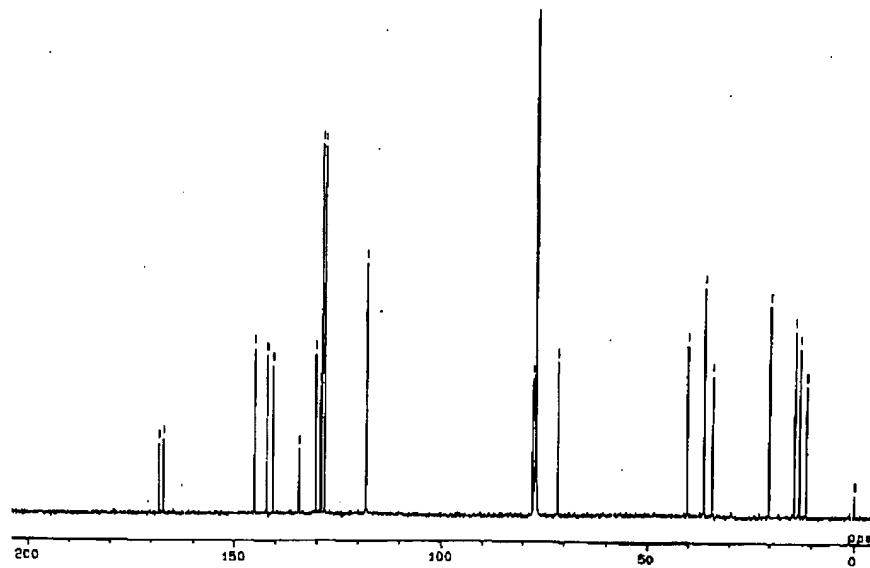
【図1】YL-03709B-A物質の¹H-NMRスペクトルである。

【図1】



【図2】YL-03709B-A物質の¹³C-NMRスペクトルである。

【図2】



ANTIMYCOTIC ANTIBIOTIC SUBSTANCE AND ITS PRODUCTION

Patent Number: JP7238018

Publication date: 1995-09-12

Inventor(s): SUGAWARA TAKEO; others: 02

Applicant(s): YAMANOUCHI PHARMACEUT CO LTD

Requested Patent: JP7238018

Application Number: JP19940027802 19940225

Priority Number(s):

IPC Classification: A61K31/22; C12P13/02

EC Classification:

Equivalents:

Abstract

PURPOSE: To obtain a new YL-03709B-A substance exhibiting strong antimycotic activity and useful as pharmaceuticals, especially an antimycotic antibiotic substance.

CONSTITUTION: This YL-03709B-A substance is expressed by formula. The compound of formula is produced by culturing a microbial strain belonging to the genus Bacillus and capable of producing YL-03709B-A substance (Bacillus sp. YL-03709B: FERM P-14126) in a medium to effect the production and accumulation of YL-03709B-A substance in the cultured product and separating the accumulated YL-03709B-A substance from the cultured product.

Data supplied from the esp@cenet database - I2